

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode eksperimental, membandingkan pengaruh peningkatan kadar *cocamide dea* terhadap karakteristik fisik dan uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* pada sabun minyak atsiri kayu manis dengan konsentrasi 3,5%.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan kadar surfaktan *cocamide dea* dengan konsentrasi 2%, 3% dan 5% .

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik dan uji aktivitas antibakteri dan diameter zona hambat dari *Staphylococcus aureus*.

4.3 Definisi Operasional

Definisi Operasional dalam penelitian ini meliputi :

- a. Sabun mandi cair adalah bentuk sediaan pembersih kulit berbentuk cair yang dibuat dari bahan dasar sabun atau deterjen dengan penambahan bahan lain yang diijinkan dan digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit (Anonim, 2017).
- b. Sabun cair kayu manis adalah sediaan semi padat berupa sabun cair yang menggunakan surfaktan *cocamide dea* dan SLS sebagai basis serta bahan lain yang diformulasikan dengan penambahan minyak atsiri kayu manis sebagai bahan aktif.
- c. Surfaktan adalah Sebuah molekul yang mengurangi tegangan permukaan air. Ini memiliki ekor hidrofobik (non-polar, "suka lemak") dan kepala hidrofilik (kutub,"suka air"). Bekerja sebagai bahan pembusa, pengemulsi dan dispersan. (Quant K.,2010)
- d. Kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang besar kemungkinannya menghasilkan efek atau perubahan pada variabel tergantung. Kelompok kontrol positif bertujuan untuk membuktikan bahwa eksperimen yang digunakan sudah tepat dan dapat menghasilkan perubahancv positif pada

- e. variabel tergantung. Adapun kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah sabun Nuvo family yang mengandung triclocarban.
- f. Uji karakteristik fisik meliputi Organoleptis, pH, bj, viskositas, dan stabilitas tinggi busa.
- g. Zona inhibisi, yaitu daerah jernih disekitar lubang sumuran yang tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang dan Labaoratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Peneltian ini dilakukan pada bulan Februari 2018 sampai dengan bulan April 2018.

4.5 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan untuk sedian sabun yaitu :

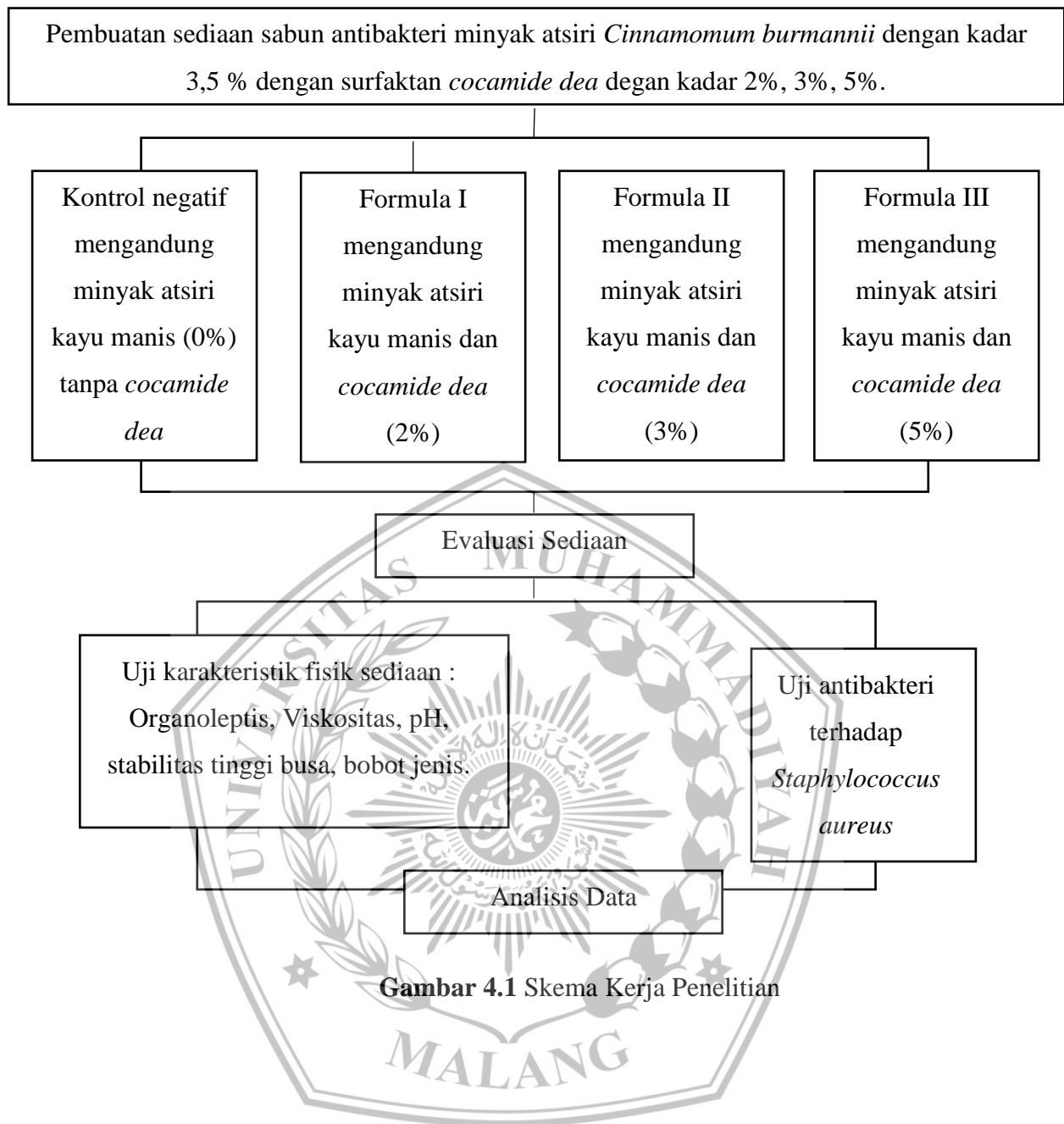
1. Minyak atsiri kayu manis diperoleh dari Lansida Group
2. Gliserin diperoleh dari PT. Bratachem
3. DMDM hydantoin diperoleh dari PT. Cipta Kimia
4. *Cocamide dea* dari Aldila Kinia
5. Disodium EDTA diperoleh dari PT. Brataco
6. *Sodium Lauryl sulfate* dari Aldila Kimia
7. Natrium Klorida dari T&T Chemicals
8. Aquadest diperoleh dari PT. Bratachem
9. BHT diperoleh dari PT. Brataco
10. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang.
11. Untuk kontrol positif yang digunakan adalah sabun Nuvo antibakteri yang diperoleh dari apotek *Century* di Malang *Town Square*.

4.6 Alat

1. Cawan petri
2. Mortir dan stamper
3. Termometer
4. Piknometer
5. Alat-alat gelas
6. pH meter
7. Neraca analitik digital (*metler toledo*)
8. Viskometer *Brookfield*
9. *Steroglass hot plate*
10. Water bath
11. Cawan porselen
12. Pipet volume
13. Inkubator
14. Jarum ose steril
15. Autoklaf

4.7 Metode Kerja

Pada penelitian ini diawali dengan pembuatan sediaan sabun minyak atsiri kayu manis dengan kadar 3,5% dan dengan penambahan surfaktan *cocamide dea* (2%, 3%, dan 5%). Terdapat 3 formula sabun antibakteri dan 1 formula sebagai kontrol negatif. Yang akan diuji karakteristik fisik (organoleptis dan homogenitas, viskositas, bj, dan stabilitas tinggi busa) dulu kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Formula 1 (F1) mengandung *cocamide dea* (2%), formula II (F2) mengandung *cocamide dea* (3%), formula III (F3) mengandung *cocamide dea* (5%) dan formula kontrol negatif (F0) tidak ditambahkan *cocamide dea*. Semua formula direplikasi 3 kali dan uji dilakukan replikasi 3 kali dengan volume masing-masing sediaan sebanyak 100 ml.



4.8 Rancangan formula

Dalam penelitian ini terdapat 3 formula sabun minyak atsiri kayu manis dengan *cocamide dea* berbagai konsentrasi.

4.8.1 Komposisi sabun anti bakteri

Tabel formula sabun minyak atsiri kayu manis dengan kadar 3,5% terdiri dari 4 formula yaitu kontrol negatif (kontrol negatif), formula 1 (formula yang mengandung *cocamide dea* dengan kadar 2%), formula 2 (formula yang mengandung *cocamide dea* 3%) dan formula 3 (formula yang mengandung *cocamide dea* dengan kadar 5 %).

Bahan penunjang pembuatan formula sabun diantaranya yang pertama adalah *sodium lauryl sulfate*, *sodium lauryl sulfate* adalah surfaktan anionik primer digunakan sebagai detergen pembusa. Kemudian *cocamide dea*, dalam sediaan sabun mandi *cocamide dea* diharapkan dapat mengurangi sifat mengiritasi yang ditimbulkan surfaktan anionik. Selain sebagai surfaktan, *cocamide dea* berpengaruh pada stabilitas busa yang dihasilkan (Fiume, 1996). Garam NaCl digunakan sebagai pengental, ion Na^+ akan berinteraksi dengan muatan surfaktan sehingga mengurangi *electrostatic repulsion* antara bagian polar surfaktan sehingga surfaktan semakin mudah membentuk *micelle* juga *micelle* yang terbentuk semakin besar, sehingga menyebabkan meningkatnya viskositas. Gliserin bekerja sebagai *moisturizer* dengan cara sebagai komponen higroskopis yang mengundang air dan mengurangi jumlah air yang meninggalkan kulit. DMDM hydantoin berfungsi pengawet karena formaldehida yang dirilis membuat lingkungan kurang menguntungkan bagi mikroorganisme dan juga dapat membunuh bakteri dengan formaldehida yang dilepaskan (Anonim, 2016). $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ digunakan sebagai chelating agent. $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ bekerja dengan bereaksi dan mengikat ion-ion logam yang ada di air, sehingga ion logam tersebut tidak beraksi dengan surfaktan-surfaktan yang ada. Kemudian BHT berfungsi sebagai pencegah atau memperlambat ketengikan karena terjadi proses oksidatif lemak dan minyak. Aquadest berfungsi sebagai pelarut (Rowe, 2009).

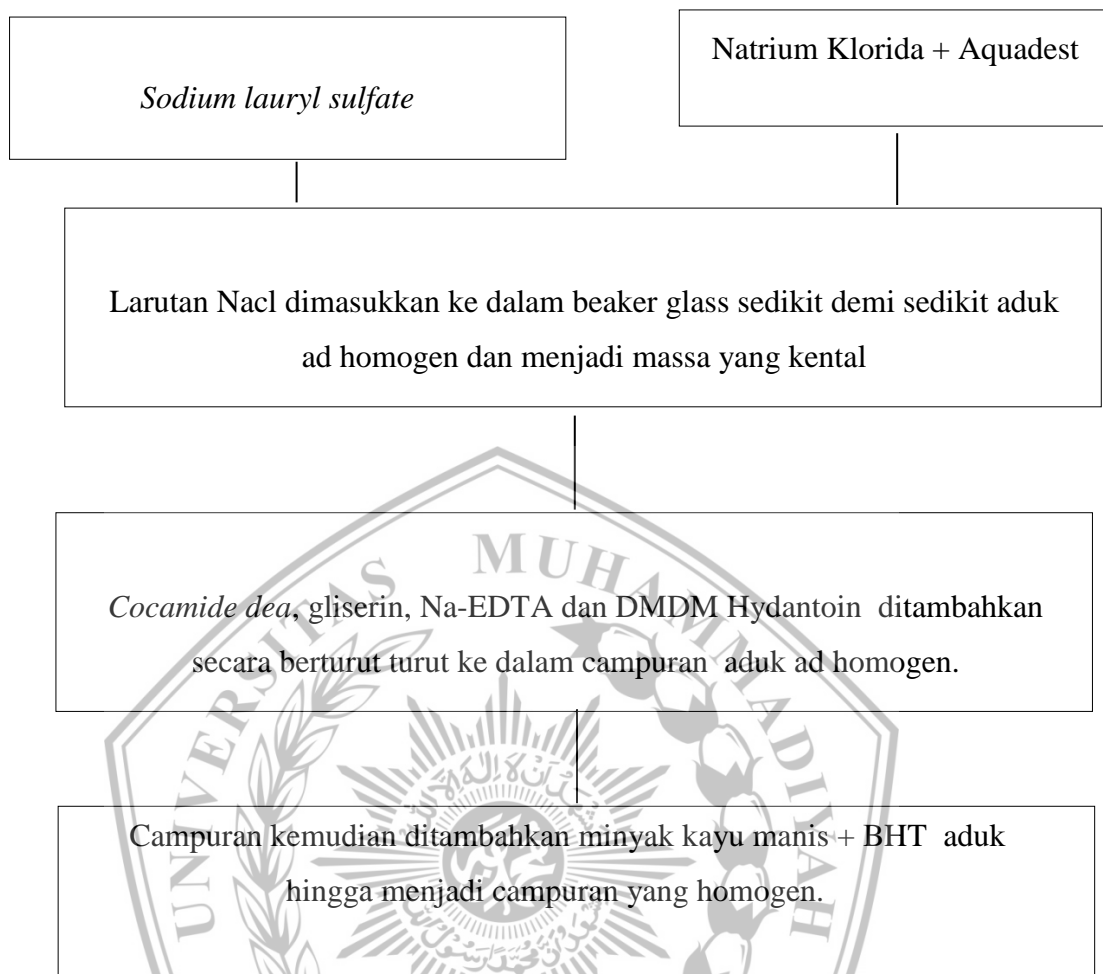
Tabel IV. 1 Formula sabun minyak atsiri kayu manis dengan kadar 3,5 %

Bahan	Fungsi	F0	F1	F2	F3
Minyak Kayu Manis	Bahan aktif	-	3,5%	3,5 %	3,5 %
<i>Cocamide dea</i>	Basis / surfaktan	5%	2 %	3 %	5 %
<i>Sodium lauryl sulfate</i>	Basis / Surfaktan	10 %	10 %	10 %	10 %
NaCl	Thickening agent	5%	5 %	5 %	5 %
Gliserin	Thickening agent	10 %	10 %	10 %	10 %
<i>DMDM hydantoin</i>	Pengawet	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Na ₂ – EDTA	Chelating agent	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
BHT	Anti Oksidan	0,1 %	0,1%	0,1%	0,1%
Aquadest	Pelarut	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

4.9 Cara pembuatan sabun antibakteri

Pembuatan sediaan sabun dimulai dengan membuat basis sabun cair. *Sodium lauryl sulfate* pada beaker glass kemudian di beaker glass yang berbeda NaCl dilarutkan dengan sedikit aquadest ad larut, kemudian masukkan larutan NaCl sedikit demi sedikit ad terbentuk masa yang kentak dan homogen kemudian di tambahkan *cocamide dea* aduk ad homogen, masukkan gliserin, Na-EDTA dan pengawet ditambahkan secara berturut turut yakni ke dalam beaker glass kemudian aduk ad homogen. Minyak atsiri kayu manis ditambahkan BHT di beaker glass lain aduk ad larut, kemudian masukkan campuran yang tadi di aduk hingga membentuk campuran yang homogen.

Skema cara pembuatan sabun antibakteri dapat dilihat pada gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Skema Kerja

4.10 Evaluasi Sediaan

4.10.1 Evalusi Fisik Sediaan

1. Organoleptis

Pengamatan organoleptis dapat di nilai dari tekstur sediaan yang stabil meliputi perubahan warna dan bau sabun serta tekstur. Sediaan harus menunjukan sediaan yang homogen (Anonim, 2017). Pengujian homogenitas ini dilakukan dengan cara mengoleskan sabun sebanyak 0,1 gram yang telah dibuat pada objek glass, kemudian dilihat apakah basis tersebut homogen dan apakah permukaannya halus merata. Apabila sediaan halus merata dapat disimpulkan bahwa sediaan tersebut homogen (Depkes RI, 1985).

2. Pemeriksaan pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan alat pH meter *basic 20⁺*. Dicuci elektroda dengan aquadest dan dikeringkan dengan tisu, kemudian dilakukan kalibrasi dengan larutan buffer standart pH 4.0 dan pH 7.0, elektroda dicuci dan dikeringkan kembali. Ditimbang sediaan sabun sebanyak 1 gram, kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 10 ml. Lalu dilakukan pengukuran pH sediaan dengan cara elektroda dimasukkan kedalam sediaan sabun dan dilihat angka yang tertera pada alat (Depkes RI, 1995). Nilai pH sabun cair yang ditetapkan SNI 4085:2017 adalah 6-8.

3. Viskositas

Pengukuran viskositas sabun diukur menggunakan alat viskometer *Brookfield* LV. Viskometer *Brookfield* adalah salah satu viskometer yang menggunakan kumparan atau gasing yang dicelupkan ke dalam zat uji dan mengukur tahanan gerak dari bagian yang berputar. Tersedia kumparan yang berbeda untuk rentang kekentalan tertentu, dan umumnya dilengkapi dengan kecepatan rotasi (FI IV, 1995). Sebanyak 80 ml sabun dimasukkan kedalam cup, kemudian memasang spindle ukuran 61 dan rotor dijalankan dengan kecepatan 6 rpm. Setelah viskometer menunjukkan angka yang stabil, hasilnya dicatat kemudian dikalikan dengan faktor pengkali (10). Berdasarkan persyaratan SNI 06-4085-1996 tentang rentang viskositas sediaan sabun cair yang memenuhi persyaratan yaitu 500-20000 cPs.

4. Stabilitas tinggi busa

Sebanyak 0,2 gram sediaan dilarutkan dalam 20 ml aquadest kemudian 10 ml larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berskala melalui dinding. Tabung reaksi tersebut ditutup kemudian di kocok kuat-kuat selama 20 detik. Tinggi busa yang terbentuk di catatat pada menit ke-0, dan menit ke-5.

5. Bobot jenis

Bersihkan piknometer, keringkan piknometer dan timbang. Masukkan sampel ke dalam piknometer sampai diatas garis tera. Tutup kemudian masukkan piknometer ke dalam rendaman air es sampai suhu 20⁰C. Permukaan air es harus

lebih tinggi daripada permukaan contoh dalam piknometer, sehingga semua isi piknometer terendam. Biarkan piknometer terendam hingga suhunya menjadi 20°C kemudian bersihkan bagian luar piknometer dengan tisu dan timbang piknometer yang berisi sampel. Ulangi pengerjaan tersebut dengan memakai air suling sebagai pengganti sampel

Perhitungan :

$$\text{Bobot jenis, } 20^{\circ}\text{C} = \frac{W_1 - W}{V}$$

Keterangan : W = Bobot pikno kosong

W₁ = Bobot piknometer dan sampel

V = Volume piknometer

4.11 Uji Aktivitas Antibakteri

4.11.1 Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP) dengan cara :

Pembuatan media *Nutrient Agar Plate* dengan cara menimbang agar nutrisi sebanyak 4,5 gram, lalu masukkan dalam gelas ukur. Tambahkan aquades sampai volume menjadi 225 ml. Larutan yang sudah larut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan agar nutrisi yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 15 ml. (Nazhifa, 2013)

4.11.2 Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, kemudian ditanamkan pada media nutrisi agar dengan cara menggores, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Mpila, 2014)

4.11.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji yang telah diremajakan pada media nutrisi agar diambil dengan kawat ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml aquadest hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *McFarland 2* (Mpila, 2012).

Tabel IV. 2 Standar Mc. Farland (Mpila, 2012)

No. Tabung Koloni	BaCl ₂ 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Jumlah
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18

Cara Pembuatan :

Larutan *Mc. Farland* 2 digunakan dengan membandingkan kekeruhan biakan bakteri pada media cair dengan kepadatan 6×10^8 sel/ml dengan langkah sebagai berikut :

- 1) Mengambil 0,2 ml larutan Barium Chlorida (BaCl₂) 1%.
- 2) Mengambil 9,8 ml larutan Asam Sulfat (H₂SO₄) 1%.
- 3) Mencampurkan larutan pada tabung reaksi, dengan perbandingan diatas.
- 4) Menyimpan larutan dalam suhu kamar dan tempat gelap serta tidak terkena matahari secara langsung.
- 5) Mengambil 3-5 koloni biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan diencerkan dengan aquades sampai dengan tercapai larutan homogen untuk mendapatkan kepadatan 6×10^8 .
- 6) Membandingkan dengan larutan standar *Mc. Farland* 2. Jika biakan bakteri *Staphylococcus aureus* belum sama dengan Larutan pembanding, maka ditambahkan aquades. Jika terlalu keruh, dapat ditambahkan bakteri dengan menggunakan jarum ose.

4.11.4 Uji Daya Hambat Bakteri

- a. Siapkan sediaan sabun yang akan di uji F1, F2, F3, K (-), dan K (+).
- b. Membuka bungkus cawan agar dan memberi label penutup masing-masing cawan agar.
- c. Menuangkan media ke dalam cawan agar sebanyak ± 15 ml dan menunggu hingga memadat ± 10 menit.

- d. Menggunakan teknik steril, menginokulasi semua cawan agar dengan masing-masing organisme uji sebagai berikut : Mencelupkan kapas steril ke dalam kultur (saline + mikroba) dan buang kelebihan inokulum dengan menekan cotton swab ke dinding bagian dalam tabung kultur. Dengan menggunakan swab, streak seluruh permukaan agar secara horizontal, vertikal, dan sekitar tepi luar cawan untuk memastikan pertumbuhan di atas seluruh permukaan.
- e. Menempatkan cakram yang telah ditetesi bahan uji tersebut pada permukaan agar yang telah ditanami bakteri menggunakan pinset steril dengan memperhatikan jarak penyimpanan cakram. (Dapat dilakukan menggunakan alat disk feeder)
- f. Perlahan tekan masing-masing disk ke bawah dengan ujung cotton swab atau pinset steril untuk memastikan cakram menempel pada permukaan agar-agar.
- g. Inkubasi semua kultur cawan dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam.
- h. Amati zona inhibisi (daerah jernih sekitar cakram disk yang tidak ditumbuhi bakteri). Perhitungan diameter zona inhibisi diukur dari penjumlahan 2 sisi dari daerah jernih yang tampak menggunakan penggaris atau jangka sorong dalam satuan millimeter yang kemudian dirata-rata. (Darson, 2003).

4.12 Analisis Data

Analisis data pada pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan cara visual yaitu mengamati sediaan secara langsung meliputi bau, rasa, warna dan tekstur yang dilakukan satu hari setelah pembuatan.

Untuk sediaan uji karakteristik mutu fisik sediaan dan uji antibakteri menggunakan uji *One-way Anova*. Analisis *One-way Anova* yaitu jenis analisis statistik parametrik digunakan untuk menguji perbedaan antara tiga kelompok (pengamatan) atau lebih. Dari data yang didapatkan dilakukan analisis statistik dengan derajat kepercayaan $\alpha = 0,05$. Untuk mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan bermakna dilihat dari harga F tabel. Apabila hasil F diperoleh F hitung > F tabel menunjukkan adanya perbedaan bermakna, sehingga dilanjutkan uji *Honesty Significant Differnece (HSD)* untuk mengetahui data mana yang berbeda (Nurbaty, 2016)